

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

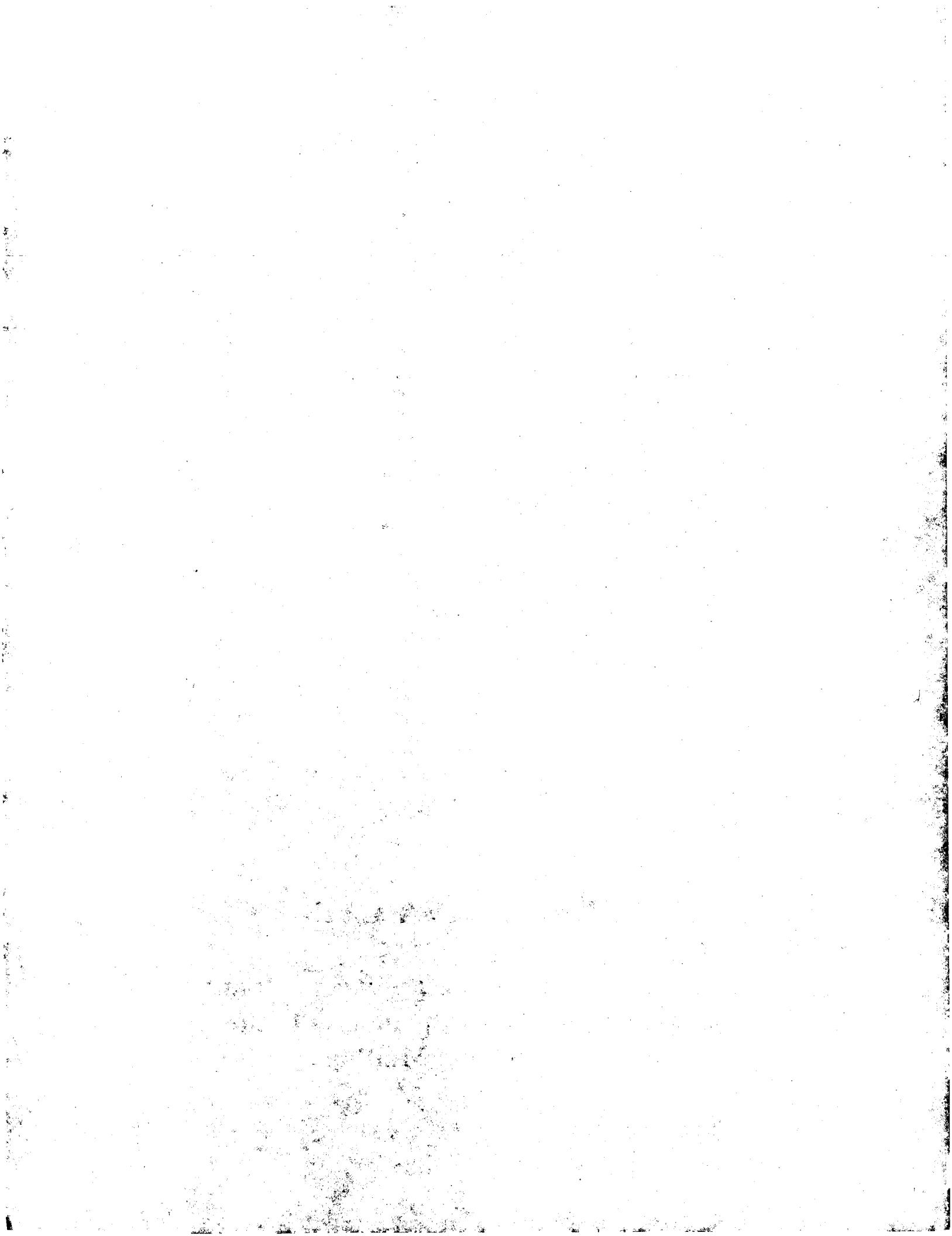
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

1065211H  
12.19.03



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

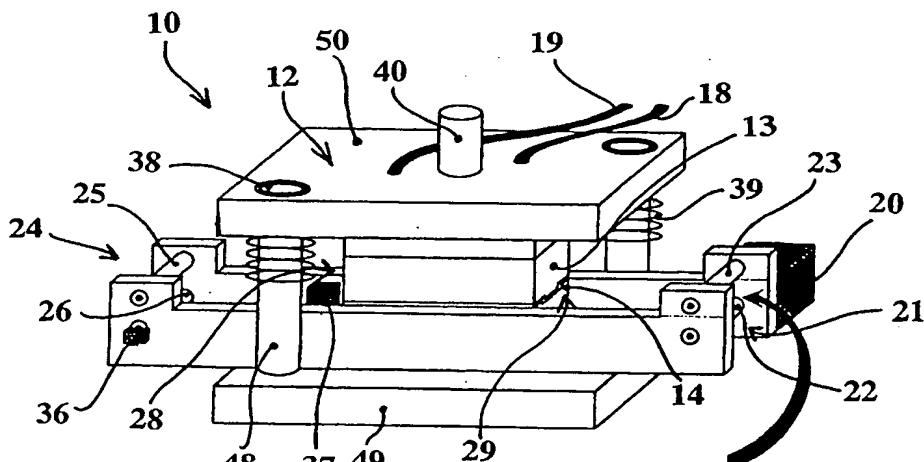
(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>B01J 19/00, C07H 21/00</b>	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/36828</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. August 1998 (27.08.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01030		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Februar 1998 (23.02.98)		
(30) Prioritätsdaten: 197 07 000.0 21. Februar 1997 (21.02.97) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCKLE GMBH [DE/DE]; Ludwig-Merkle-Strasse 3, D-89143 Blaubeuren (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRUGGER, Hermann [DE/DE]; Im Gäßle 13, D-89171 Illerkirchberg (DE). REMBE, Christian [DE/DE]; Einsteinstrasse 17/8, D-89077 Ulm (DE). BADER, Raoul [DE/DE]; Gustavsbürgerweg 26, D-55130 Mainz-Laubenheim (DE). HOFER, Eberhard, P. [DE/DE]; Sonnenstrasse 4, D-89173 Lonsee (DE). SELIGER, Hartmut [DE/DE]; Hasenweg 1, D-89275 Elchingen (DE).		
(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter, Kinzebach & Partner, Postfach 86 06 49, D-81633 München (DE).		

(54) Title: AUTOMATED MACROMOLECULE SYNTHESISING PROCESS AND DEVICE

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR AUTOMATISCHEN SYNTHESE VON MAKROMOLEKÜLEN

(57) Abstract

An automated process and device are disclosed for synthesising macromolecules on a strip of support material (11). The device has at least one hermetically closable synthesis module (12) with reaction chambers (15) and fluid lines (18, 19) for filling and emptying the reaction chambers (15) with reaction media. The support material (11) can be introduced into the synthesis module (12) and brought into contact with the reaction chambers (15). Transport means (20-26) are also provided for displacing the support material (11) over a certain distance and can be actuated by a controller. Also disclosed is the use of such a device for synthesising oligonucleotides bound to a functionalised support material, in particular for producing oligonucleotide libraries.



**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur automatischen Synthese von Makromolekülen auf einem bandartigen Trägermaterial (11). Die Vorrichtung weist mindestens ein nach außen abdichtbares Synthesemodul (12) auf, das Reaktionskammern (15) und Fluidleitungen (18, 19) zum Befüllen und Entleeren der Reaktionskammern (15) mit und von Reaktionsmedien umfaßt, wobei das Trägermaterial (11) in das Synthesemodul (12) einföhrbar ist und mit den Reaktionskammern (15) in Kontakt gebracht werden kann. Außerdem sind Transportmittel (20-26) zum Verschieben des Trägermaterials (11) um eine bestimmte Wegstrecke vorgesehen, welche durch eine Steuereinrichtung betätigbar sind. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer derartigen Vorrichtung zur Synthese von auf einem funktionalisierten Trägermaterial gebundenen Oligonukleotiden, insbesondere zur Herstellung von Oligonukleotid-Bibliotheken.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Vorrichtung und Verfahren zur automatischen Synthese von Makromolekülen

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur automatischen Synthese von Makromolekülen, insbesondere von oligonucleotiden, und die Verwendung einer solchen Vorrichtung.

Synthetische Oligonucleotidsequenzen werden routinemäßig in automatenunterstützten Verfahren hergestellt. Als Synthons werden hierbei Nucleosidamidophosphite, Nucleosid-H-phosphonate oder andere in der Literatur beschriebene monomere oder oligomere Bausteine von biologischen oder abiotisch modifizierten Nucleinsäuren verwendet (Sonveaux, E. (1986) *Bioorg. Chem.* 14, 274-325; Uhlmann, E. and Peyman, A. (1990) *Chem. Rev.* 90: 544-584). Die Synthesen werden in der Regel an Festphasen durchgeführt. Typischerweise sind die für die Oligonucleotidsynthese verwendeten automatischen Apparate so aufgebaut, daß Trägermaterialien in granulierter Form verwendet werden. Diese werden als Festbett in einer Säule von Reagenzien, Lösungsmitteln und anderen Flüssigphasen durchströmt. In ähnlicher Weise werden Membranen als durchspülbare Festphasen angewandt. Die Dosierung der flüssigen Phasen erfolgt in der Regel zeitgesteuert mittels eines Prozeßrechners in einem kommerziell erhältlichen Syntheseautomaten. Die Kettenverlängerung erfolgt schrittweise. Für die jeweilige Anlagerung eines Monomeren wird ein vielstufiger Reaktionszyklus durchlaufen. Die Ausbeute, die bei einem Kettenverlängerungszyklus erzielt wird, wird in der Regel bei der Abspaltung der Schutzgruppe durch spektroskopische oder andere analytische Methoden gemessen.

Als granulierte Trägermaterialien sind zum Beispiel Kieselgel, controlled pore glass, Polystyrol, Kompositmaterialien, u.a. in Form unregelmäßig geformter Partikel oder von Kugeln unterschiedlichen Durchmessers im Gebrauch. Für makroporöse, nicht quellbare Trägermaterialien wurden, unabhängig vom Material, Beladungen in der Größenordnung von 0,8-0,9 µMol Nucleosid/m<sup>2</sup> äußerer und innerer Oberfläche gemessen (Kotschi,

U. (1988) *Dissertation Universität Ulm, Deutschland*).

Routinemäßig werden Ansätze im Bereich von ca. 0,2 µMol bis 1 µMol wachsender Ketten im Automaten gefahren.

- 5 Die gleichzeitige Synthese mehrerer Oligonucleotidsequenzen kann einerseits auf rein präparativer Basis durch Vermehrung der Zahl der anzusteuernden mit Polymerträger gefüllten Säulen erfolgen, andererseits könnenträgergefüllte Kartuschen zum Beispiel in stapelbarer Anordnung parallel in gleichartige
- 10 Synthesezyklen inkorporiert werden (Seliger, H. et al. (1989) *Bioengineering* 6: 144-147). In neuerer Zeit sind vielfach auch oberflächenfunktionalisierte Flachmaterialien als Träger für parallele Oligonucleotidsynthesen verwendet worden. Hierzu zählen
- 15 Glasplatten (Maskos, U. and Southern E.M. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20: 1679-1684), Silicium-Wafer (Pease, A.C. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5022-5026), aber auch oberflächenfunktionalisierte Polypropylen-Folien (Matson, R.S. et al. (1994) *Analytical Biochemistry* 217: 306-310). Die
- 20 Zielsetzung bei allen diesen Trägerverfahren geht dahin, auf einer gegebenen Trägerfläche eine möglichst große Zahl von "Synthesepunkten" unterzubringen, um damit analytisch / diagnostische Zielsetzungen zu verfolgen.
- 25 Die Zahl der parallel zu synthetisierenden Oligomersequenzen ist bei den üblichen kommerziell erhältlichen Syntheseautomaten einerseits durch den apparativen Aufwand, andererseits durch die Anordnung der Trägerelemente im Stapel begrenzt. Dadurch ist eine permanente Ausnutzung der vorhanden Gerätekapazität
- 30 aufgrund von Leerlaufzeiten nicht möglich, da die einzelnen Kartuschen immer von Hand aus dem Syntheseautomaten genommen werden müssen und neue angehängt werden müssen.

Bei den verwendeten Flachträgern für analytisch/diagnostische Zielsetzungen sind die pro "pixel" synthetisierten Oligonucleotidmengen extrem niedrig (im unteren picomol-Bereich), d.h. für präparative Zwecke normalerweise ungeeignet. Weiterhin ist die Reinheit des auf einem

"Synthesepunkt" aufgepropften Oligonucleotidmaterials durch das Auflösungsvermögen der "pixel" begrenzt, d.h. in der Regel lässt sich das "Verschmieren" einer Oligonucleotidsynthese in angrenzende Synthesepunkte nur schwer vermeiden.

5 Im Gegensatz zu diesen Arbeiten haben die Erfinder der vorliegenden Anmeldung bereits früher Polypropylenfolien durch chemische Oberflächenfunktionalisierung so hergerichtet, daß Beladungen mit Nucleosid von 5 - 7 nmol/cm<sup>2</sup> (50 - 70 µmol/m<sup>2</sup>) ermöglicht werden. Solche extrem hoch, aber ausschließlich oberflächlich beladenen Flachträger ermöglichen es, Oligonucleotid-Synthesen auf Oberflächensegmenten im cm<sup>2</sup>-Bereich durchzuführen und dabei eine für biochemisch/präparative Untersuchungen ausreichende Menge an 10 Nucleotidsequenzen zu erzeugen (Seliger, H. et al. (1995) *Reactive & functional polymers* 26:119-126). Die außergewöhnlich gute Zugänglichkeit der Oberflächenbeladung für gelöste Reagenzien wurde durch die Synthese eines 200 Basen umfassenden 15 Oligonucleotids in einer Einzelsynthese demonstriert (Bader, R. et al. (1997) *Nucleotides & Nucleosides* 16: 829-833).

In der deutschen Offenlegungsschrift DE 42 06 488 A2 ist eine Vorrichtung zur Durchführung zeitgleich oder sequentiell ablaufender chemischer Reaktionen beschrieben, die aus vier 25 übereinanderliegenden Stäben besteht, deren Kontaktflächen eine luftdichte Abdichtung bewirken.

In der europäischen Patentanmeldung EP 0 358 433 A2 ist eine Vorrichtung zur kontinuierlichen Polymersynthese beschrieben, 30 bei der eine bandartige Trägerfolie durch mehrere Tauchbäder geführt wird.

In WO 96/15450 ist ein gitterartig in einzelne Reaktionsfelder unterteiltes mikrolektronisches Halbleiter-Array beschrieben. 35 Reagenzien können in die einzelnen Felder apliziert werden.

In einer Artikel von J. Weiler et al. (1996, *Analytical Biochemistry* 243: 218-227) wird eine Vorrichtung zur

Oligonucleotidsynthese und deren Anwendung bei der DNA-Sequenzierung beschrieben. Eine Polypropylen-Folie wird mit länglichen Reaktionskammern in Kontakt gebracht. Nach einem ersten Reaktionsschritt wird die Folie um 90° gedreht und eine weitere Kopplungsreaktion durchgeführt.

In einem Artikel von R.S. Matson et al. (1995, *Analytical Biochemistry* 224, 110-116) wird die Oligonucleotidsynthese auf Polypropylenträgern und deren Anwendung bei der Lokalisation von Gendefekten beschrieben.

In der Dissertation von Raoul Bader, Universität Ulm, Deutschland, 1996, wurde eine manuell betätigbare Vorrichtung beschrieben, mit deren Hilfe Oligonucleotide auf einer funktionalisierten bandartigen Trägerfolie unter Verwendung eines herkömmlichen Synthesearmaten synthetisiert werden können (die wichtigsten Ergebnisse dieser Dissertation wurden kürzlich von R. Bader et al. in *Nucleosides and Nucleotides*, 16, 835-842 (1997) beschrieben). Die dort und in der Dissertation von Bader beschriebene Vorrichtung weist ein nach außen abdichtbares Synthesemodul auf, das Reaktionskammern und Fluidleitungen zum Befüllen und Entleeren der Reaktionskammern mit und von Reaktionsmedien umfaßt, wobei die bandartige Trägerfolie in das Synthesemodul einföhrbar ist und durch Zusammenpressen zweier Elemente des Synthesemoduls mit den Reaktionskammern in Kontakt gebracht werden kann.

Wenn die beiden Modulelemente wieder voneinander gelöst werden, kann das Folienband eine bestimmte Wegstrecke weitertransportiert werden, die dem Abstand zweier Synthesekammern entspricht. Der Trägerfolie, beispielsweise eines Polypropylenstreifens, kann auf dem Streifen eine lineare Abfolge von Synthesefeldern erzeugt werden, die entweder sequentiell voneinander unabhängige oder sequentiell überlappende Oligonucleotide enthalten. Mit dieser manuellen Vorrichtung konnte die prinzipielle Funktion des von Bader et al. vorgeschlagenen Syntheseverfahrens gezeigt werden. Die bekannte Vorrichtung ist jedoch nicht zur automatischen

Synthese von Makromolekülen auf einem bandartigen Trägermaterial geeignet, insbesondere ist auch die Positioniergenauigkeit der Trägerfolie in dem Synthesemodul bei manueller Einstellung gering.

5

- Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung anzugeben, welche die automatische Synthese von Makromolekülen auf einem Flachträgermaterial, insbesondere auf einem bandartigen Flachträgermaterial erlaubt und welche die 10 Totzeiten bei der Synthese vermeidet. Die Vorrichtung soll insbesondere nach einmaliger Vorgabe der Prozeßparameter und der gewünschten Sequenz vollautomatisch alle notwendigen Schritte durchführen können.
- 15 Diese Aufgabe wird gelöst durch die Vorrichtung zur automatischen Synthese von Makromolekülen auf einem bandartigen Trägermaterial gemäß vorliegendem Hauptanspruch.

Die Vorrichtung umfaßt mindestens ein nach außen abdichtbares 20 Synthesemodul, das Reaktionskammern und Fluidleitungen zum Befüllen und Entleeren der Reaktionskammern mit und von Reaktionsmedien aufweist, wobei das Trägermaterial in das Synthesemodul einführbar ist und mit den Reaktionskammern in Kontakt gebracht werden kann. Erfindungsgemäß umfaßt die 25 Vorrichtung außerdem Transportmittel zum Verschieben des Trägermaterials um eine bestimmte Wegstrecke, welche durch eine Steuereinrichtung betätigbar sind.

Erfindungsgemäß wird demnach vorgeschlagen, steuerbare 30 Transportmittel vorzusehen, welche das Verschieben des Trägermaterials um eine bestimmte Wegstrecke erlauben. Die Steuereinrichtung arbeitet dabei vorzugsweise mit einem an sich bekannten Syntheseautomaten zusammen, der die notwendigen Reagenzien für die Kondensation der Monomere an die auf dem 35 Trägerband entstehende Sequenz bereitstellt und den gesamten Reaktionszyklus steuert und überwacht. Nach jedem Kondensationsschritt sendet der Syntheseautomat ein Signal an die Steuereinrichtung für die Transportmittel und das Band wird

eine bestimmte Wegstrecke weitertransportiert, die genau dem Abstand der Reaktionskammern im Synthesemodul entspricht. Wenn die Reaktionskammern linear in Richtung der Verschiebung des Trägerbandes angeordnet sind, befinden sich - abgesehen von der 5 in Verschiebungsrichtung ersten Synthesekammer - alle Synthesekammern auf Feldern der Folie, auf denen im vorherigen Schritt die Kopplung eines Monomers durchgeführt wurde.

- Als Trägermaterial kann beispielsweise eine Polypropylenfolie 10 (PP-Folie) verwendet werden, die nachträglich auf der Oberfläche funktionalisiert wurde. Bei dieser Funktionalisierung werden Hydroxylgruppen auf der Oberfläche eingeführt, an denen sich die Oligomersynthese durchführen lässt. Während eines Kopplungsschrittes müssen sich die 15 Reaktionskammern leicht und vollständig mit den benötigten Reagenzien befüllen und entleeren lassen. Bei der Oligonucleotidsynthese muß beispielsweise bei der Kopplung eines Nucleosidphosphorsäureesteramids auf absolut wasserfreies Arbeiten geachtet werden, während beim nachfolgenden 20 Oxidationsschritt Wasser notwendig ist. Auch müssen sich die Reaktionskammern möglichst gut nach außen abdichten lassen, insbesondere ist bei der Oligonucleotidsynthese auf absolut luftdichtes Arbeiten zu achten.
- 25 Die Transportmittel umfassen bevorzugt ein erstes motorbetriebenes Zugmittel, das nach dem Austrittsbereich des Trägermaterials aus dem Synthesemodul angeordnet ist. Dabei kann es sich beispielsweise um zwei gegeneinander preßbare Walzen handeln, zwischen denen das Trägerband eingeklemmt ist. 30 Eine der Walzen kann mit einem Motor angetrieben werden, so daß bei Betätigung des Motors das Trägerband transportiert wird. Handelt es sich bei dem Trägerband um eine relativ flexible Folie, so ist mit einer solchen Anordnung ein unidirektonaler Transport des Trägerbandes möglich. Ist der Träger relativ 35 starr, so kann durch Umschalten der Laufrichtung des Motors ein bidirektonaler Transport erreicht werden.

Bei der Steuereinrichtung kann es sich beispielsweise um einen

speziellen Mikrocontroller handeln. Es kann jedoch auch ein entsprechend programmierter herkömmlicher Computer, etwa ein Laptop oder eine Workstation mit einer geeigneten Schnittstelle verwendet werden.

5

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfassen die Transportmittel außerdem ein zweites motorbetriebenes Zugmittel, das vor dem Eintrittsbereich des Trägermaterials in das Synthesemodul angeordnet ist.

10

Gemäß dieser Ausführungsform kann auch bei einer flexiblen Folie ein bidirektionaler Bandtransport durchgeführt werden. Je nach Verschiebungsrichtung des Bandes arbeitet ein Zugmittel als Antrieb, während das auf der gegenüberliegenden Seite des 15 Synthesemoduls angeordnete Zugmittel im Leerlauf betrieben wird. Bei einem bidirektionalen Transport des Bandes lassen sich Oligomersequenzen synthetisieren, deren Länge einem Vielfachen der Anzahl der Reaktionskammern entspricht. Im Gegensatz zu einer Erhöhung der Anzahl der Reaktionskammern 20 lassen sich so beispielsweise Oligomersequenzen mit einem geringeren Überlappungsbereich synthetisieren.

Unabhängig davon ob lediglich ein Zugmittel oder zwei Zugmittel vorgesehen sind, wird das lediglich als Führung dienende 25 Walzenpaar vorzugsweise eine gewisse Reibung aufweisen, so daß das Band stets unter einer gewissen Spannung transportiert wird.

Bevorzugt werden die Zugmittel von Schrittmotoren angetrieben.

30 Mit Schrittmotoren ist eine präzise und reproduzierbare Bewegung und Positionierung des Trägerbandes erreichbar. Die Steuereinrichtung kann dabei eine Absolutverschiebung durchführen, indem für eine bestimmte Verschiebung eine bestimmte Schrittzahl des Motors vorgegeben wird. Es ist 35 jedoch auch möglich, ein Trägerband zu verwenden, das mit Bandmarken versehen ist, so daß die genaue Position des Bandes, beispielsweise mit optischen Sensoren kontrolliert werden kann, deren Signale wiederum von der Steuereinrichtung verarbeitet

werden.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform weist das Synthesemodul im Ein- und Austrittsbereich des Trägermaterials

5 Dichtlippen auf. Die Abdichtung des Synthesemoduls kann bei einer einfachen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit Dichtlippen erfolgen, die direkt am Ein- und Austrittsbereich des Trägerbandes vorgesehen sind.

- 10 Bei einer besonders bevorzugten Variante der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfaßt jedes Synthesemodul wenigstens zwei gegeneinander bewegliche Modulelemente, die jeweils der Ober- und Unterseite des Trägerbandes zugeordnet sind, wobei zumindest ein Modulelement mit einem durch die
- 15 Steuereinrichtung betätigbaren Stellmittel verbunden ist, welches ein lösbares, dichtes Aneinanderpressen der beiden Modulelemente ermöglicht. Wenn, wie bei der Oligonucleotidsynthese, auf einem vollständigen Luftabschluß geachtet werden muß, ist eine zweiteilige Ausführung der
- 20 Modulelemente vorzuziehen. Die beiden Modulelemente können dabei gegeneinander bewegt werden und schließen zwischen sich die Ober- und Unterseite des Trägerbandes ein. Zum Transport des Trägerbandes werden die Modulelemente gelöst und das Band ist zwischen ihnen frei verschieblich. Zur Durchführung eines
- 25 Syntheseschritts werden die Modulelemente durch Stellmittel gegeneinander gepreßt, so daß einerseits das Trägerband in seiner Position fixiert ist und andererseits die Reaktionskammern gegen die Umgebung luftdicht abgedichtet sind. Die Stellmittel werden ebenfalls von der Steuereinrichtung
- 30 betätigt, so daß die automatische Koordinierung des Lösens der Modulelemente und des Transportes des Trägerbandes gewährleistet ist.

In einem der Modulelemente sind üblicherweise die Reaktionskammern angeordnet. Wenn aber Makromoleküle parallel auf beiden Seiten des Trägerbandes synthetisiert werden sollen, sind vorzugsweise in beiden Modulelementen Reaktionskammern vorgesehen.

Bei dem Stellglied handelt es sich vorzugsweise um einen Druckzylinder, beispielsweise einen pneumatisch oder hydraulisch betätigbaren Zylinder. Der Druckzylinder kann doppelt wirkend ausgebildet sein, das heißt der Zylinderkolben

5 wird in beiden Wirkungsrichtungen mit Druck beaufschlagt. Er kann auch federbelastet sein.

Bei einer vorteilhaften Ausführungsform weist jede Reaktionskammer eine Einlaßöffnung- und eine Auslaßöffnung auf,

10 über welche die Reaktionskammer mit den Fluidleitungen kommuniziert. Wenn die Reaktionskammern länglich ausgebildet sind, befinden sich die Öffnungen vorzugsweise an den Enden der Kammern.

15 Die Fluidleitungen für den Zu- und Abfluß der Reaktionsmedien können beispielsweise als Sammelleitungen ausgebildet sein, die sich in Leitungen zu den einzelnen Kammern aufspalten. Vorzugswiese ist aber zwischen mindestens zwei Reaktionskammern ein Verbindungskanal vorgesehen.

20 Vorteilhaft sind die Reaktionskammern und ihre Verbindungsanäle mäanderförmig angeordnet.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der oben beschriebenen Vorrichtung zur Synthese von auf einem funktionalisierten Trägermaterial gebundenen Oligonukleotiden.

25 Sie eignet sich vor allem zur Herstellung von Oligonucleotid-Bibliotheken, insbesondere zur Herstellung von sequenzüberlappenden Oligonucleotid-Bibliotheken.

30 Eine besonders bevorzugte Verwendung ist in der Herstellung von Diagnostik-Teststreifen zu sehen.

35 Sie ist auch zur Herstellung von Teststreifen zur DNA-Sequenzierung geeignet.

Schließlich betrifft die Erfindung ein Verfahren zur

## 10

automatischen Synthese von Oligonucleotiden auf einem Trägerband mittels einer Synthesevorrichtung mit einem zumindest zwei Modulelemente umfassenden Synthesemodul, wobei man das Trägerband in das Synthesemodul transportiert und dort 5 positioniert, das Synthesemodul durch Zusammenpressen der beiden Modulelemente nach außen abdichtet, einen Syntheseschritt mit Hilfe eines üblichen Syntheseautomaten durchführt, anschließend die beiden Teile des Synthesemoduls voneinander löst und das Band um eine definierte Wegstrecke 10 weitertransportiert und erneut positioniert. Erfindungsgemäß ist das Verfahren vollständig automatisiert, wobei man zur Steuerung und Koordination von Transport und Positionierung des Trägerbandes, des Zusammenpressens der Modulelemente, jedes 15 Syntheseschritts und des Lösens der Modulelemente ein Taktsignal ausnützt, das der Syntheseautomat abgibt und für das ein Mikrocontroller empfänglich ist, welcher wiederum Aktoren wie Schrittmotoren, pneumatische Pressen und ähnliches steuert.

Das erhaltene Syntheseprodukt ist dabei aufgrund der gewählten 20 Dimension der Reaktionskammern in Abstimmung mit der Beladung des bandartigen Flachträgers so gewählt, daß ausreichend Material für nahezu alle weiteren Anwendungen des Produktes vorliegt.

25 Durch die Verwendung des Flachträgers ist eine schnelle und kostengünstige Synthese möglich. Die Verwendung des Flachträgers ermöglicht desweiteren eine hohe Reinheit des Syntheseproduktes, weshalb weitestgehend auf weitere Reinigungsschritte verzichtet werden kann. Da die Vorrichtung 30 den automatischen Transport des Flachträgers ermöglicht, entfallen die sonst üblichen Totzeiten des Syntheseautomaten. Die Verwendung des Flachträgers beliebiger Länge erlaubt eine eindeutige Zuordnung und Lokalisierung der hergestellten Sequenzen auf dem Träger. Die Vorrichtung läßt sich an den 35 unterschiedlichsten Syntheseautomaten betreiben und ist daher universell mit nahezu allen am Markt erhältlichen Geräten einzusetzen.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden unter Bezugnahme auf in beigefügten Zeichnungen dargestellte Ausführungsbeispiele ausführlicher erläutert. In den Zeichnungen zeigt:

- 5                   Figur 1: eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Synthesevorrichtung, die an einen kommerziell erhältlichen Syntheseautomaten angeschlossen ist, wobei aus Übersichtsgründen die Transportmittel für das Trägerband nicht dargestellt sind;
- 10                  Figur 2: eine detailliertere Darstellung der erfindungsgemäßen Synthesevorrichtung aus Figur 1 mit schematisch dargestellten Transportmitteln für das Trägerband;
- 15                  Figur 3: ein Detail der Transportmittel aus Figur 2;
- 20                  Figur 4: eine Stirnansicht einer zweiteiligen Ausführungsform des Synthesemoduls der Vorrichtung der Figur 2;
- 25                  Figur 5: eine perspektivische schematische Darstellung des beweglichen Oberteils des Synthesemoduls der Figur 4;
- 30                  Figur 6: eine Unteransicht des Modulelementes der Figur 5;
- 35                  Figur 7: eine der Figur 6 entsprechende Ansicht einer Variante des oberen Modulelementes;
- Figur 8: einen Längsschnitt des Modulelementes der Figur 7;
- Figur 9: ein beispielhaftes Blockschaltbild, welches die Prozeßautomatisierung der Vorrichtung gemäß Figur 1 verdeutlicht; und
- 35 Figur 10: ein beispielhaftes Ablaufdiagramm zur Prozeßsteuerung mit dem Steuergerät gemäß Figur 9.

In Figur 1 erkennt man den prinzipiellen Aufbau der erfundungsgemäßen Synthesevorrichtung 10, die mit einem herkömmlichen Syntheseautomaten 32 (Eppendorf/Biotronik Ecosyn D300) verbunden ist. Der Syntheseautomat 32 weist ein Display 33 und eine Bedienungstastatur 34 auf, über die er mit den notwendigen Prozeßdaten und der gewünschten Nucleotidsequenz programmiert werden kann. Der Syntheseautomat 32 stellt alle für die Oligonucleotidsynthese erforderlichen Chemikalien zusammen, steuert die benötigten Volumina und den gesamten Reaktionsablauf. Die benötigten Chemikalien kann der Automat beispielsweise aus Vorratsflaschen 35 abpumpen.

Die erfundungsgemäße Synthesevorrichtung 10 weist ein Synthesemodul 12 auf, welches aus einem ersten Modulelement 13 und einem zweiten Modulelement 14 besteht. Zwischen den beiden Modulelementen ist das funktionalisierte Trägerband 11 geführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Transportmittel für das Trägerband 11 in Figur 1 nicht dargestellt. Man erkennt jedoch eine pneumatische Presse 30, die mit dem beweglichen ersten Modulelement 13 zusammenwirkt und diese bei Durchführung eines Syntheseschrittes gegen das darunterliegende zweite Modulelement 14 preßt. Dadurch werden die Reaktionskammern des Synthesemoduls gegen die Umgebung luftdicht verschlossen. Mit Hilfe eines Filterdruckminderers lässt sich die Druckkraft in weiten Grenzen einstellen. Alternativ kann eine andere, dem Stand der Technik entsprechende Ausführung von Presse verwendet werden. Vor der Verschiebung des Bandes 11 wird das erste Modulelement 13 vom zweiten Modulelement 14 gelöst, so daß das Band freigegeben wird. Im dargestellten Beispiel wird eine direkt wirkende Pneumatikpresse mit doppelt wirkendem Zylinder verwendet, d.h. der Stöbel wird in beide Richtungen per Luftdruck bewegt (Presse Nr. 24, Fa. Schmidt Feintechnik GmbH, St. Georgen, Deutschland).

35 Die erfundungsgemäße Vorrichtung ist detaillierter in Figur 2 dargestellt; dort allerdings ohne Trägerband. Man erkennt wiederum das erste Modulelement 13 und das zweite Modulelement 14 des Synthesemoduls 12. Das Synthesemodul weist einen

Eintrittsbereich 28 für das Trägerband und einen Austrittsbereich 29 auf. Dem Austrittsbereich 29 nachgeordnet erkennt man Zugmittel, die aus einem von einem Schrittmotor 20 angetriebenen Walzenpaar 21 bestehen. Das Walzenpaar 21 ist 5 außerdem in Figur 3 etwas detaillierter in einem größeren Maßstab dargestellt. Die vom Motor angetriebene Walze 22 und die Andruckwalze 23 werden leicht gegeneinander gedrückt (Pfeil in Figur 3). Das Trägerband 11 kann zwischen ihnen hindurchgeführt werden, wie insbesondere aus Figur 3 10 hervorgeht. Im vorliegenden Beispiel ist die Vorrichtung 10 für einen unidirektionalen Transport des Folienbandes 11 vorgesehen, so daß am gegenüberliegenden Ende der Vorrichtung, das heißt in der Nähe des Eintrittsbereiches 28 des 15 Trägerbandes in das Synthesemodul 12 ein nicht angetriebenes zweites Walzenpaar 24 als Führung für das Band vorgesehen ist. Das zweite Walzenpaar 24 besteht wiederum aus einer Andruckwalze 25 und einer Gegenwalze 26. Für einen 20 bidirektionalen Transport könnte man vorsehen, entweder die Walze 25 oder die Walze 26 ebenfalls mit einem Schrittmotor zu versehen, wobei das in Figur 1 gezeigte Steuergerät je nach gewünschter Vorschubrichtung die Betätigung eines der beiden 25 Motoren bewirkt.

Beim Transport des Trägerbandes 11 wird mit Hilfe einer 25 Lichtschranke 37 überprüft, ob das Ende des Bandes am Eingang 28 des Synthesemoduls 12 angelangt ist. Ist das Trägerband 11 zu Ende, wird die Presse 30 geschlossen und die automatische Steuerung bricht den Prozeß ab. Dadurch ist sichergestellt, daß 30 sich bei unbeobachteter Synthese immer ein Trägermaterial 11 im Synthesemodul 12 befindet.

Das Synthesemodul 12 befindet sich dabei zwischen zwei Stahlplatten, einer Grundplatte 49 und einer Anschlagplatte 50. Das erste Element 13 des Synthesemoduls 12 wird von der 35 pneumatischen Presse 30 betätigt. Zu diesem Zweck weist sie zu einen Führungsbolzen 40 für die Presse auf. Gegen die Anschlagplatte 50 kommt ein (nicht dargestellter) Stöbel der Presse 30 in Anlage. Die Anschlagplatte 50 wird durch zwei

Messinggleitlager 38 geführt, in welche Führungsstifte 48 eingreifen, die in der Grundplatte 49 der Synthesevorrichtung 10 verankert sind. Die Anschlagplatte 50 liegt auf zwei Sätzen Tellerfedern 39, welche das Synthesemodul 12 mit einer Kraft von 2.8 kN öffnen. Bei einem Luftdruck von 6 bar wird das Synthesemodul mit einer resultierenden Kraft von 5.7 kN (Kraft des Presse minus Gegenkraft der Federn) abgedichtet. Wenn das Synthesemodul geöffnet ist, kann das Trägerband 11 transportiert werden.

10

Außerdem erkennt man in Figur 2 die Zufuhrleitung 18 und die Abflußleitung 19, mit denen Chemikalien von dem Syntheseautomaten 30 in die erfundungsgemäß Synthesevorrichtung geführt werden bzw. aus dem Synthesemodul 15 in den Automaten 30 rückgeführt werden (siehe auch Figur 9).

In Fig. 4 erkennt man die Stirnansicht einer zweiteiligen Variante des Synthesemoduls 12. Das erste Modulelement 13 ist gegen das zweite Modulelement 14 beweglich. Die beiden 20 Modulelemente bestehen vorzugsweise aus Teflon, so daß sie leicht zu reinigen und chemisch weitgehend inert sind. Beim Zusammendrücken der Modulelemente ist eine gute Abdichtung erhältlich. Dies wird insbesondere durch die dargestellte Form unterstützt, bei der das obere Modulelement 13 einen Vorsprung 25 41 aufweist, der beim dargestellten Prototyp eine Höhe h von 2 mm besitzt. Der Vorsprung 41 kann in einen Einschnitt 42 mit einer Tiefe d von 1mm im zweiten Modulelement 14 gedrückt werden.

30 In Fig. 5 ist eine perspektivische Darstellung von unten auf das erste Modulelement 13 dargestellt. Im Vorsprung 41 sind die Reaktionskammern 15 ausgespart. Die Reaktionskammern 15 sind in der Darstellung der Fig. 6, die eine Unteransicht des Modulelementes der Fig. 5 ist, besser zu erkennen. Das 35 Modulelement weist im dargestellten Beispiel fünfzehn parallele längliche Reaktionskammern 15 auf. Jeder Reaktionskanal besitzt eine Länge l<sub>1</sub> von ca. 10 mm und eine Breite b<sub>2</sub> von 2 mm. Die Breite b<sub>1</sub> des Vorsprungs 41 des Modulelementes 13 beträgt ca.

20 mm. Zwischen den Reaktionskammern sind Verbindungskanäle 31 mit einer Länge l2 von 3mm und einer Breite b3 von 1 mm vorgesehen, die jeweils ein Ende einer Reaktionskammer mit dem Anfang der nachfolgenden Kammer verbinden. Es entsteht dabei 5 die dargestellte mäanderförmige Struktur, so daß Verbindungskanäle nur bei jedem zweiten Syntheseschritt auf entsprechende Synthesefelder auf dem Träger treffen. Selbst wenn die Verbindungskanäle daher zum Träger offen sind, entstehen in diesen Bereichen nur Sequenzen mit verkürzter 10 Länge, die für den jeweiligen Einsatzzweck des Trägers unproblematisch sind. Am Anfang und Ende der mäanderartigen Struktur der Reaktionskanäle ist eine Einlaßöffnung 16 bzw. eine Auslaßöffnung 17 vorgesehen, die über die Fluidleitungen 18,19 mit dem Syntheseautomaten 32 kommunizieren.

15 Die hier genannten Größenangaben sind nur beispielhaft für den beschriebenen Prototyp zu sehen. Es können auch, insbesondere bei nicht-präparativen Synthesen wesentlich kleinere Abmessungen gewählt werden, vor allem wenn andere Materialien 20 als Teflon verwendet werden, etwa Halbleiter-Chips mit entsprechend geätzten Strukturen.

Fig. 7 zeigt eine weitere Variante der Reaktionskammern des ersten Synthesemoduls 13. Im Gegensatz zur Ausführungsform der 25 Figur 6 sind hier die einzelnen Reaktionskammern 43 nicht über Verbindungskanäle miteinander verbunden. Vielmehr weist jede Reaktionskammer einen eigenen Einlaß 44 und einen eigenen Auslaß 45 auf.

30 In Fig. 8 ist ein Schnitt durch das Modulelement 13 der Fig. 7 entlang der Linie VIII-VIII in Fig. 7 dargestellt. Man erkennt, daß die Auslässe 45 jeder Kammer 43 über Verteilerkanäle 47 in einem gemeinsamen Sammelkanal 46 münden, der wiederum durch die Fluidleitung 19 mit dem Syntheseautomaten 32 verbunden ist. In 35 entsprechender Anordnung, hier aber nicht dargestellt - sind die Einlässe 44 der Reaktionskammern 43 über Verteilerkanäle und einen Sammelkanal mit der Fluidleitung 18 verbunden, über die Reagenzien aus dem Syntheseautomaten 32 in die Kammern 43

gefördert werden. Die dargestellte Variante des Modulelementes 13 hat den Vorteil, daß die einzelnen Reaktionskammern schneller mit den Reagenzien gespült werden können. Die Herstellung eines derartigen Modulelementes mit Sammel- und 5 Verteilerkanälen ist dann besonders einfach, wenn es selbst aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist, wie in Figur 8 durch die unterschiedliche Schraffur angedeutet wurde.

In Fig. 9 ist ein Blockdiagramm eines beispielhaften 10 Steuergerätes 27 dargestellt, welches abhängig von Signalen des Syntheseautomaten 32 sowohl die pneumatische Presse 30 als auch den Schrittmotor 20 betätigt. Der hier verwendete Motor 20 bewegt die Folie 11 im  $\mu\text{m}$ -Bereich. Zusammen mit einem handelsüblichen Syntheseautomaten gewährleistet die 15 erfindungsgemäße Vorrichtung die automatische Herstellung von Oligomeren. Das Steuergerät 27 besteht aus einer Microcontrollerschaltung mit Eingabetasten, Display, Motorsteuerung, Programm- und Datenspeicher und Schnittstellen für Presse und Syntheseautomat. Der Microcontroller, welcher 20 den zeitlichen Ablauf der Synthese steuert, kommuniziert mit dem Syntheseautomat und beeinflußt die Aktoren wie Motor und Presse. Für die Steuerung wird eine geeignete Ansteuer-Software erstellt. Dabei werden Programmteile nach deren Funktion in einzelne Segmente aufgeteilt. Daher ergeben sich sehr 25 universell einsetzbare Unterprogramme, die z.B. komplett die Ansteuerung des Displays oder des Datenspeichers übernehmen. Um das Programm offen für andere Anwendungen zu halten, werden Prozeßschritte in das Programm aufgenommen, die einen sehr variablen Einsatz unterschiedlichster Synthesemodule erlauben. 30 Das Programm kann beispielsweise in einem Speicher, etwa einem EPROM des Steuergeräts dauerhaft abgespeichert werden. Er behält die Daten auch bei abgeschalteter Betriebsspannung im Speicher. Bei dem hier gewählten Microcontroller handelt es sich beispielsweise um den SAB80C535 von Siemens 35 (High-Performance 8-Bit CMOS Single-Chip Microcontrollers SABB0C515/80C 535, Data Sheet, Siemens AG, München, 1995). Dieser steuert den gesamten Ablauf des Prozesses.

In Fig. 10 ist ein typischer Ablauf des automatischen Syntheseverfahrens dargestellt. Beim Einschalten hat man die Möglichkeit, spezielle Parameter in einem Power-on-Reset-Menü einzustellen. Bei den Parametern handelt es sich um den

- 5 Trägervorschub und Zähler bzw. Timer für den Prozeßablauf. Wenn der Automat gestartet wird, können in den Parametermenüs keine Änderungen mehr vorgenommen werden. Dieser Zustand wird durch eine Leuchtdiode angezeigt. Der Benutzer wird nun aufgefordert, die Presse zu schließen und den Synthesautomaten zu starten.
- 10 Der aktuelle Zustand des Steuergerätes wird ab jetzt im Hauptmenü angezeigt, in welches man nach dem Starten automatisch gelangt. Mit einer Taste kann man in die manuelle Prozeß-Steuerung wechseln. Im automatischen Betriebsmodus wird jedoch der weitere Prozeßablauf durch das Zusammenspiel von
- 15 Mikrocontroller und Synthesautomat selbstätig gesteuert.

Im folgenden sind bevorzugte Anwendungsbeispiele der erfindungsgemäßen Vorrichtung beschrieben:

- 20 Beispiel 1: Automatische Synthese von aufeinanderfolgenden sequentiell unabhängigen Oligonucleotidfeldern

Durch die Ankopplung eines kommerziellen Synthesautomaten 32 an die in den Figuren 1 und 2 beispielhaft dargestellte

- 25 Synthesevorrichtung 10 kann eine parallele Synthese von Oligonucleotiden, deren Sequenz beliebig wählbar ist, auf einem Flachträger, etwa einem Folienband 11, durchgeführt werden. Wird z.B. ein Viersäulen-Gerät verwendet, können vier voneinander unabhängige, linear angeordnete Synthesemodule 12 an
- 30 den Automaten 32 angeschlossen werden. Es ist auch denkbar, unabhängige Reaktionskammern oder Gruppen von Reaktionskammer innerhalb eines Moduls vorzusehen. Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden die Module (oder das Modul) mit den integrierten unabhängigen Reaktionskammern und dem dazwischen befindlichen Flachträger nach aussen hin absolut dicht verschliessen, und der Synthesautomat führt die parallele Synthese auf dem Flachträger in den unabhängigen Feldern (Reaktionskammern) durch. Nach Beendigung aller vier paralleler

Synthesen erhält die erfindungsgemäße Vorrichtung von dem Syntheseautomaten 32 ein definiertes Signal, welches die Steuereinheit 27 veranlasst, das Modul 12 zu öffnen und den Flachträger 11 soweit aus dem Synthesemodul zu transportieren, daß nun jedem Feld ein neuer Abschnitt des Flachträgers 11 zur Verfügung steht. Als Beispiel sei angenommen, daß die Reaktionsfelder (Kammern) eine Breite von 1 cm haben und der Abstand voneinander auch 1 cm sei. Bei vier Feldern muß demnach der Träger um  $4 \times (1\text{cm} + 1\text{cm}) = 8\text{ cm}$  weitertransportiert werden. Da der Flachträger in einer beliebigen Länge zur Verfügung stehen kann, ist somit eine Synthese ohne Unterbrechung möglich. Ähnlich einem Kassettenrecorder kann der Flachträger dann durch den Automaten geführt werden, wobei das Band jeweils zur Synthese angehalten wird und nach Vollendung der Synthese weitergeführt werden kann.

Beispiel 2: Automatische Synthese einer Abfolge von sequenzüberlappenden Oligonucleotiden

Die Automatisierung mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann auch auf ein Verfahren zur Erzeugung sequenzüberlappender Oligonucleotide angewandt werden. Bei diesem Verfahren ist es notwendig, den Flachträger nach jeder Kopplung um eine exakte Länge weiterzutransportieren. Durch Verwendung des automatischen Apparats kann nun dieser Transport selbstständig durchgeführt werden. Somit ist die Synthese einer Anordnung sequenziell überlappender Oligonucleotide über einen längeren Zeitraum ohne weitere Kontrolle durch den Betreiber der Anlage möglich.

30

Beispiel 3: Prozeßautomatisierung

Um eine einfache Handhabung und eine flexible Einsetzbarkeit der erfindungsgemäßen Vorrichtung zu gewährleisten, wird eine Steuerung mit einem Microcontroller realisiert. Als Reaktionskammer 15 für die chemische Synthese dient ein Synthesemodul 12, welches aus einem beliebigen, gegenüber der verwendeten Chemie inerten Material, beispielsweise

Polytetrafluorethylen (PTFE), besteht. Die Oligomere werden auf einem Flachträger 11 (z.B. einer funktionalisierten Polypropylenfolie) synthetisiert, welcher sich innerhalb des Synthesemoduls 12 befindet. Um zu gewährleisten, daß die

5 Reaktionskammer 15 absolut dicht ist, wird das Synthesemodul 12 mit einer Presse 30 abgedichtet. Die für die Synthese nötigen chemischen Schritte werden auf dem Syntheseautomat 32 programmiert, wobei an definierten Stellen Triggerimpulse für das Steuergerät abgegeben werden können. Der Flachträger 11

10 kann dabei automatisch mit einem Motor 20 sehr präzise positioniert werden. Hier wurde für den Transport ein Schrittmotor eingesetzt. Der Flachträger 11 befindet sich dabei zwischen zwei Walzen, wovon eine über ein einfaches Getriebe vom Motor angetrieben wird.

**Patentansprüche**

1. Vorrichtung zur automatischen Synthese von Makromolekülen auf einem bandartigen Trägermaterial (11), mit mindestens einem nach außen abdichtbaren Synthesemodul (12), das Reaktionskammern (15,43) und Fluidleitungen (18,19,45,46) zum Befüllen und Entleeren der Reaktionskammern (15,43) mit und von Reaktionsmedien umfaßt, wobei das Trägermaterial (11) in das Synthesemodul (12) einführbar ist und mit den Reaktionskammern (15,43) in Kontakt gebracht werden kann,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung außerdem Transportmittel (20-26) zum Verschieben des Trägermaterials (11) um eine bestimmte Wegstrecke umfaßt, welche durch eine Steuereinrichtung (27) betätigbar sind.
2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Transportmittel ein erstes motorbetriebenes Zugmittel (20-23) umfassen, das nach dem Austrittsbereich (29) des Trägermaterials (11) aus dem Synthesemodul (12) angeordnet ist.
- 25 3. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Transportmittel ein zweites motorbetriebenes Zugmittel (24-26) umfassen, das vor dem Eintrittsbereich (28) des Trägermaterials (11) in das Synthesemodul (12) angeordnet ist.
- 30 4. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß jedes Zugmittel einen Schrittmotor (20) aufweist.
- 35 5. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Synthesemodul (12) im Ein- und Austrittsbereich (28,29) des Trägerbandes Dichtlippen aufweist.

6. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß jedes Synthesemodul (12) wenigstens zwei gegeneinander bewegliche Modulelemente (13,14) umfaßt, die jeweils der Ober- und Unterseite des Trägerbandes (11) zugeordnet sind, wobei zumindest ein Modulelement (12) mit einem durch die Steuereinrichtung betätigbaren Stellmittel (30) verbunden ist, welches ein lösbares, dichtes Aneinanderpressen der beiden Modulelemente (13,14) ermöglicht.
7. Vorrichtung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß in beiden Modulelementen (13,14) Reaktionskammern vorgesehen sind.
8. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Stellmittel (30) ein Druckzylinder ist.
9. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß jede Reaktionskammer (15,43) eine Einlaßöffnung (16) und eine Auslaßöffnung (17) aufweist, über welche die Reaktionskammer mit den Fluidleitungen (18,19,45,46) kommuniziert.
10. Vorrichtung gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen mindestens zwei benachbarten Reaktionskammern (15) ein Verbindungskanal (31) vorgesehen ist.
11. Vorrichtung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionskammern (15) und ihre Verbindungskanäle (31) mäanderförmig angeordnet sind.
12. Verwendung der Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Synthese von auf einem funktionalisierten Trägermaterial gebundenen Oligonukleotiden.

13. Verwendung nach Anspruch 12, zur Herstellung von oligonucleotid-Bibliotheken, insbesondere zur Herstellung von sequenzüberlappenden Oligonucleotid-Bibliotheken.

5

14. Verwendung nach Anspruch 13 zur Herstellung von Diagnostik-Teststreifen.

15. Verwendung nach Anspruch 14 zur Herstellung von  
10 Teststreifen zur DNA-Sequenzierung.

16. Verfahren zur automatischen Synthese von Oligonucleotiden auf einem Trägerband (11) mittels einer Synthesevorrichtung mit einem zumindest zwei Modulelementen (13,14) umfassenden Synthesemodul (12), insbesondere mittels einer Vorrichtung nach einem der Anspüche 6 bis 15 11, wobei man  
- das Trägerband (11) in das Synthesemodul (12) transportiert und dort positioniert,  
- das Synthesemodul (12) durch Zusammenpressen der beiden Modulelemente (13,14) nach außen abdichtet,  
- einen Syntheseschritt mit Hilfe eines üblichen Syntheseautomaten (32) durchführt,  
- anschließend die beiden Elemente (13,14) des 20 Synthesemoduls (12) voneinander löst und das Band um eine definierte Wegstrecke weitertransportiert und 25 erneut positioniert,  
**dadurch gekennzeichnet, daß**  
Transport und Positionierung des Trägerbandes (11), das 30 Zusammenpressen der Modulelemente (13,14), jeder Syntheseschritt und das Lösen der Modulelemente (13,14) durch ein Taktsignal des Syntheseautomaten (30) gesteuert und koordiniert werden.

1 / 5

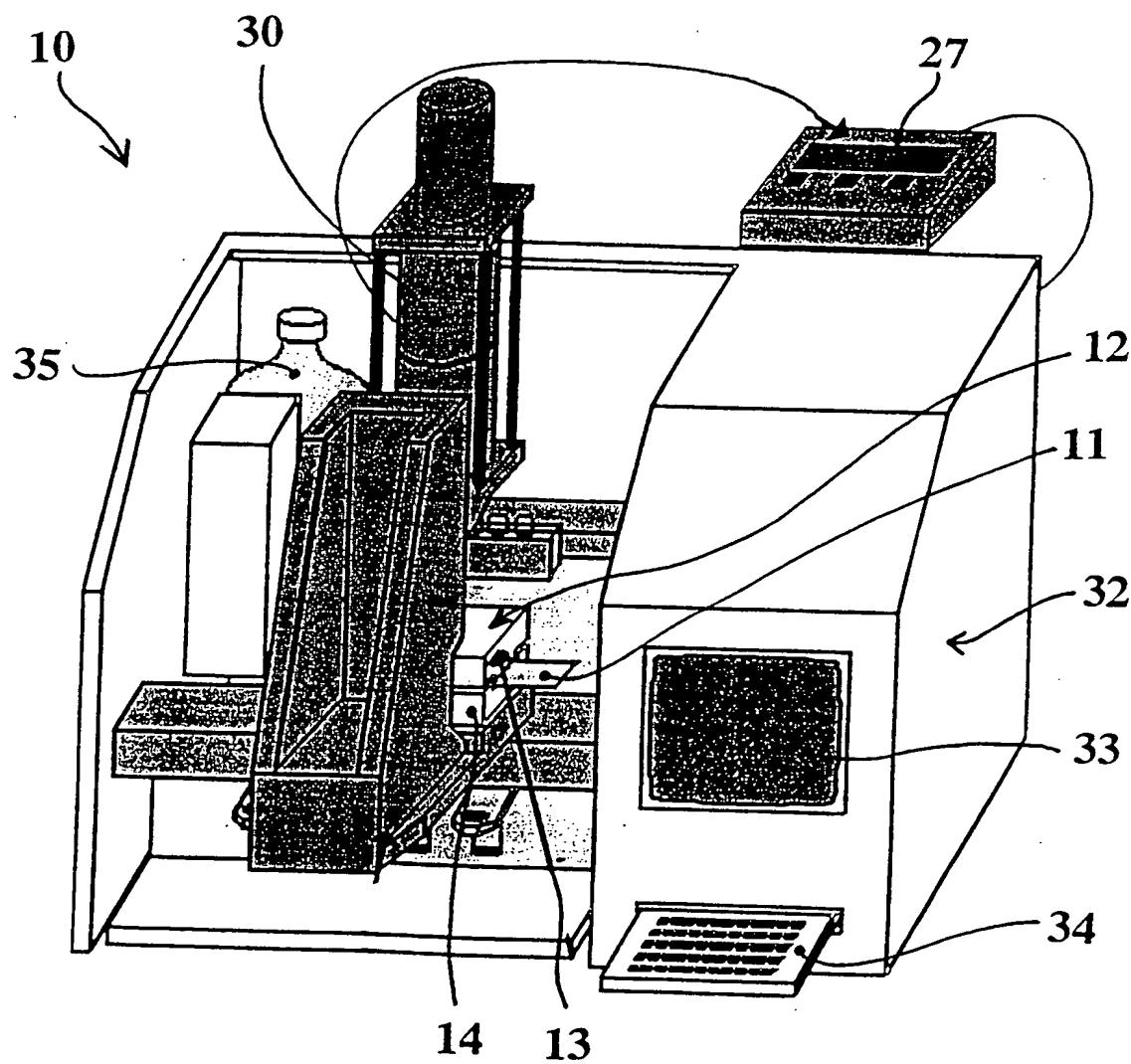
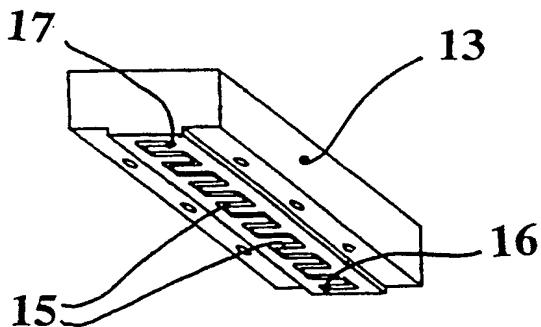
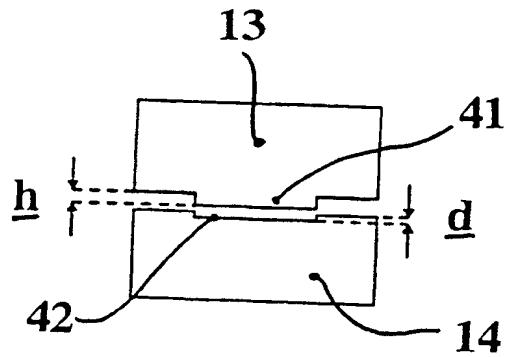
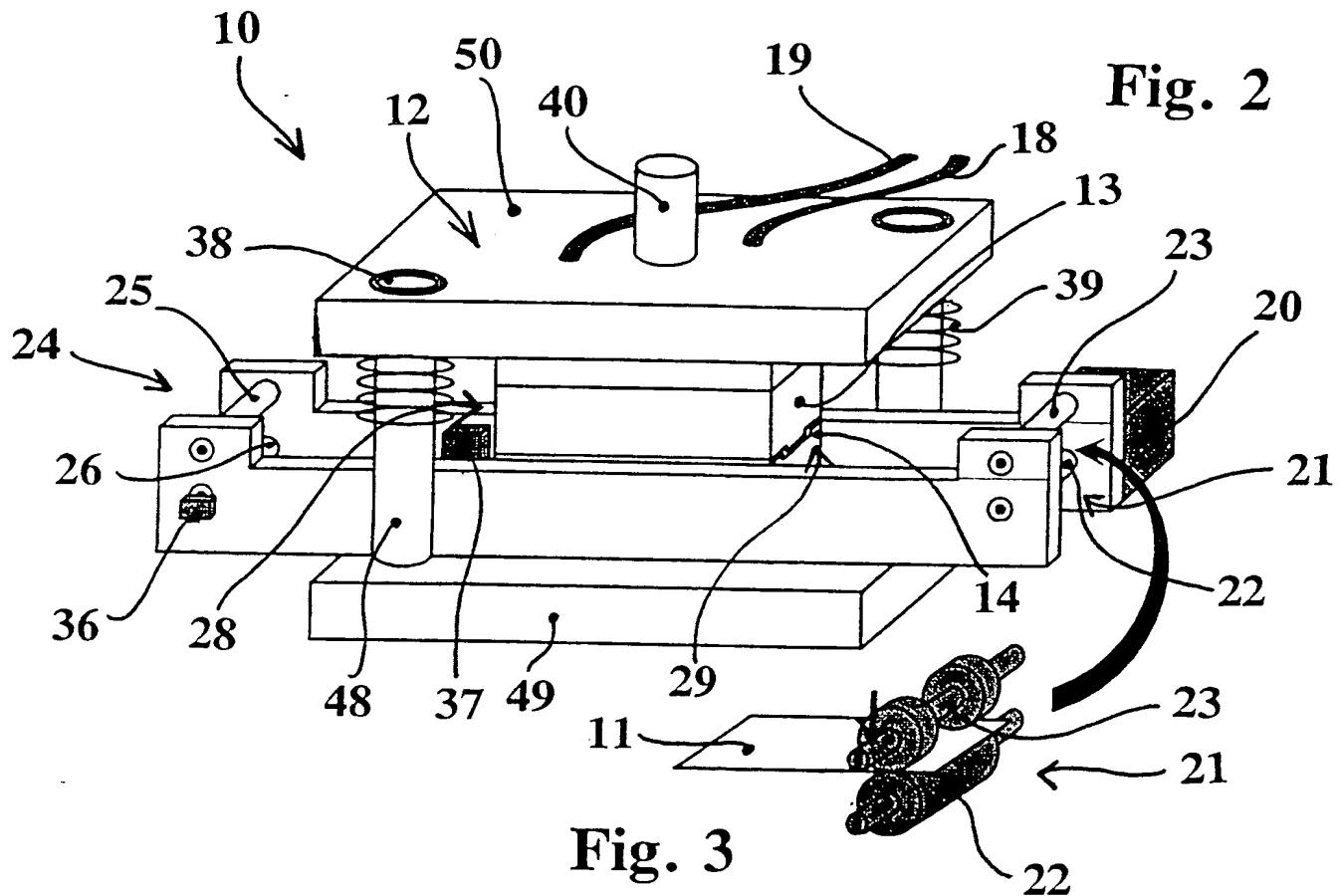


Fig. 1

2 / 5

**Fig. 5**

3 / 5

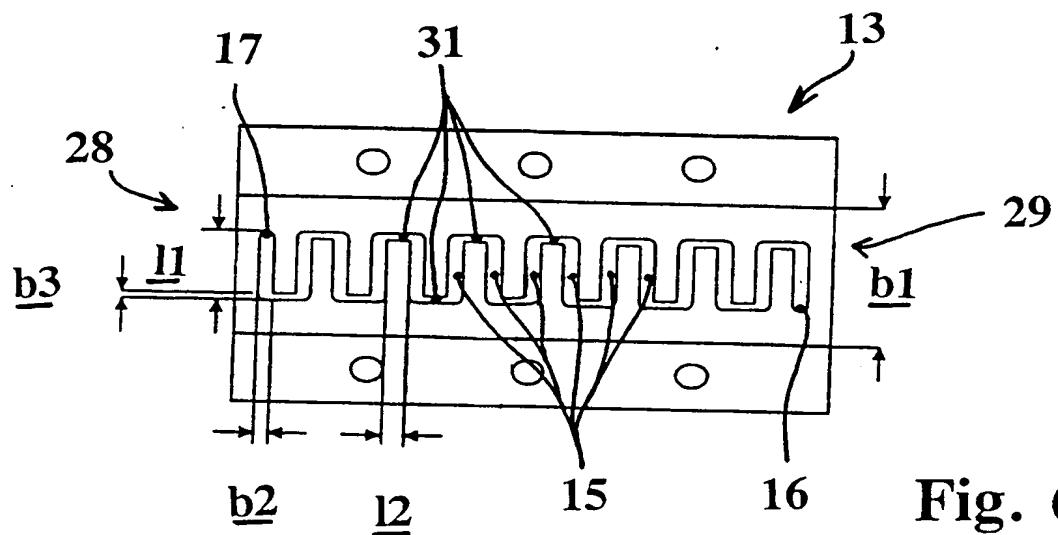


Fig. 6

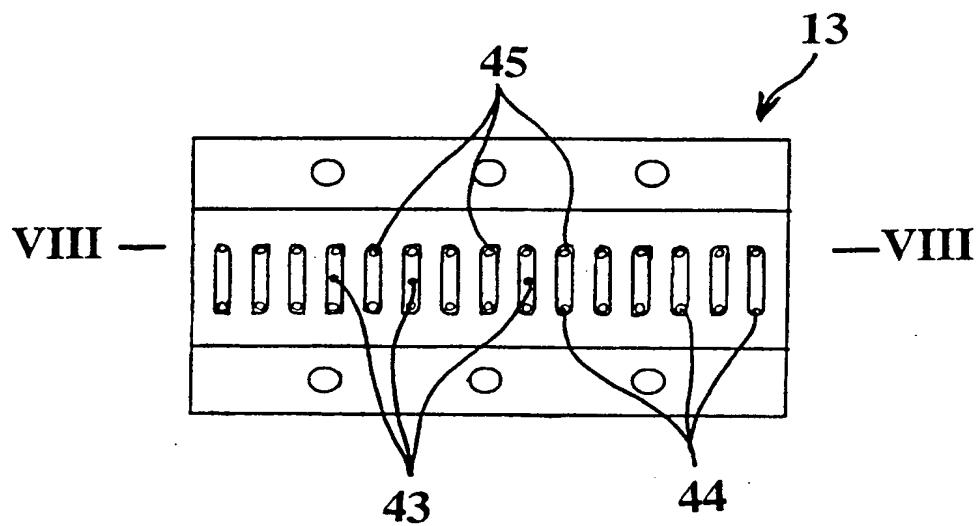


Fig. 7

4 / 5

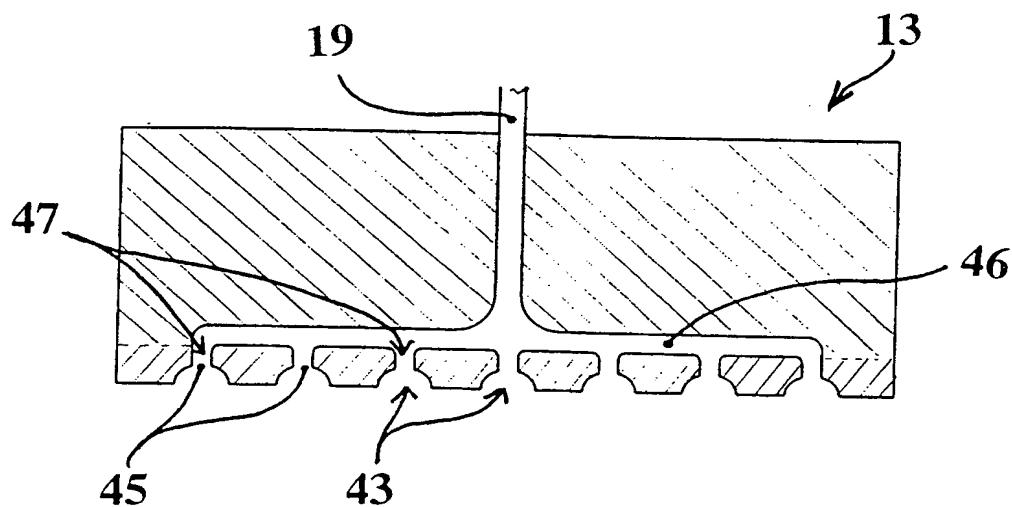


Fig. 8

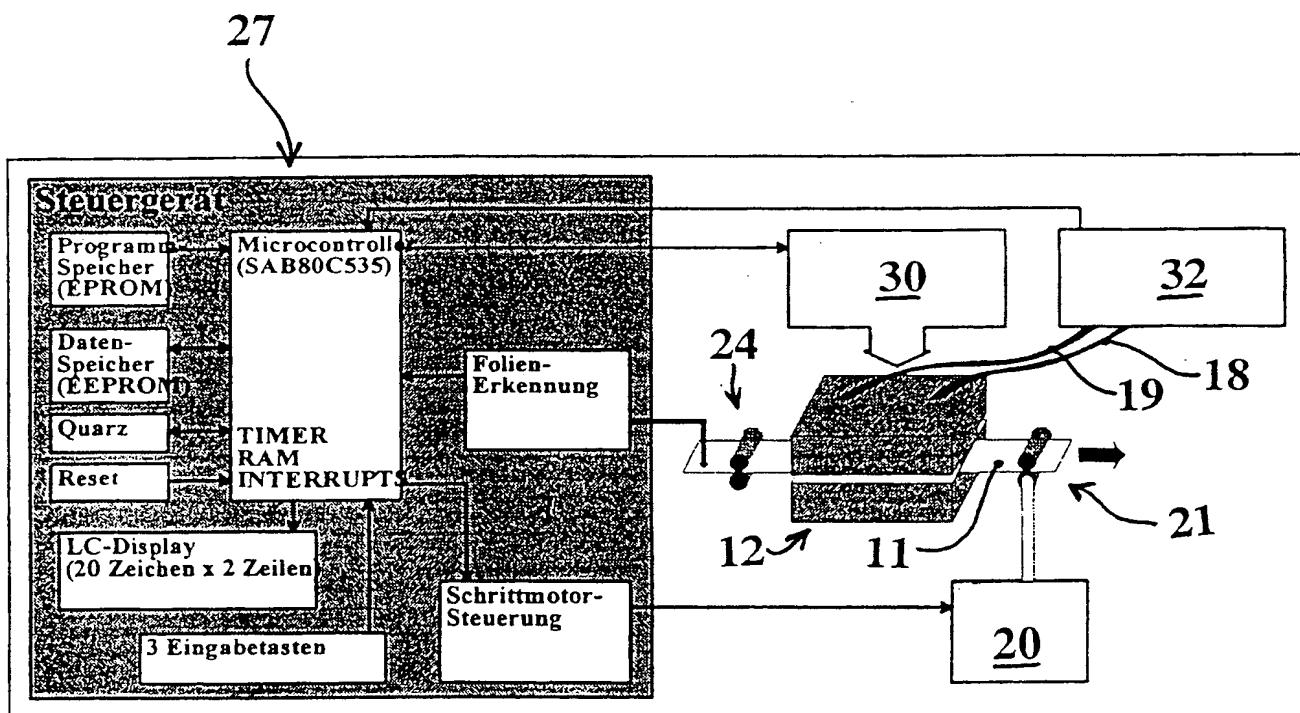


Fig. 9

5 / 5

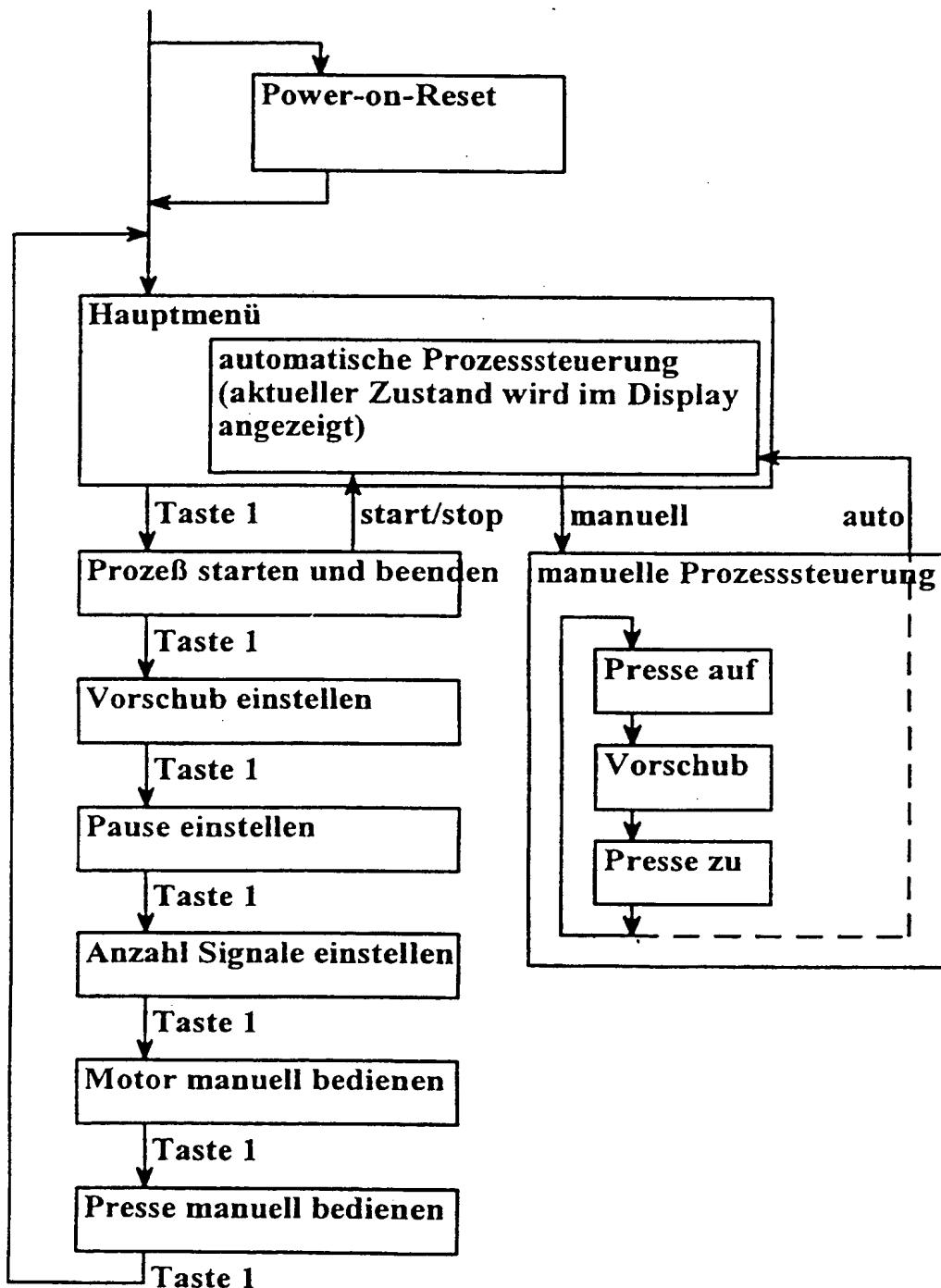


Fig. 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/01030

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 B01J19/00 C07H21/00

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 B01J C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 11748 A (BECKMAN INSTRUMENTS, INC.) 4 May 1995 see page 2, line 7 – page 3, line 15 see page 9, line 1 – line 24 see page 12, line 13 – line 15 see page 14, line 13 – page 15, line 25 see figures 6,15	1,6,8,9, 12-16
A	---	2-5,10
A	WO 93 17785 A (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM ) 16 September 1993 cited in the application see page 11, paragraph 4 – paragraph 5 see figures	4
P,A	WO 97 26986 A (NOVARTIS AG) 31 July 1997  see the whole document -----	1,5-7, 9-16

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 1998

Date of mailing of the international search report

25/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stevnsborg, N

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/01030

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9511748	A 04-05-1995	US EP JP	5429807 A 0675760 A 8505407 T		04-07-1995 11-10-1995 11-06-1996
WO 9317785	A 16-09-1993	DE DE EP JP JP US	4206488 A 59300794 D 0629144 A 2620508 B 7507480 T 5538694 A		16-09-1993 23-11-1995 21-12-1994 18-06-1997 24-08-1995 23-07-1996
WO 9726986	A 31-07-1997	AU	1543097 A		20-08-1997

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01030

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 B01J19/00 C07H21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 B01J C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 11748 A (BECKMAN INSTRUMENTS, INC.) 4.Mai 1995 siehe Seite 2, Zeile 7 – Seite 3, Zeile 15 siehe Seite 9, Zeile 1 – Zeile 24 siehe Seite 12, Zeile 13 – Zeile 15 siehe Seite 14, Zeile 13 – Seite 15, Zeile 25 siehe Abbildungen 6,15	1,6,8,9, 12-16
A	---	2-5,10
A	WO 93 17785 A (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGZENTRUM ) 16.September 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 11, Absatz 4 – Absatz 5 siehe Abbildungen	4
	---	-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "%" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
17.Juni 1998	25/06/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Stevnsborg , N
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 98/01030

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	WO 97 26986 A (NOVARTIS AG) 31.Juli 1997 siehe das ganze Dokument -----	1,5-7, 9-16

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

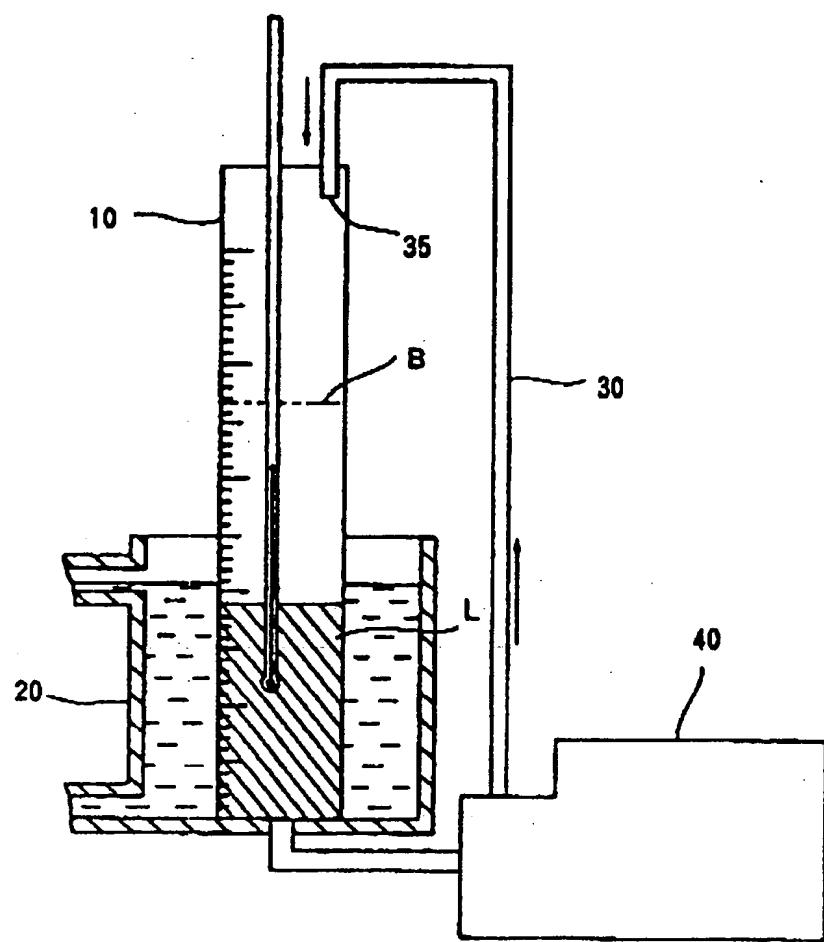
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01030

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
WO 9511748	A	04-05-1995	US	5429807 A	04-07-1995
			EP	0675760 A	11-10-1995
			JP	8505407 T	11-06-1996
-----					
WO 9317785	A	16-09-1993	DE	4206488 A	16-09-1993
			DE	59300794 D	23-11-1995
			EP	0629144 A	21-12-1994
			JP	2620508 B	18-06-1997
			JP	7507480 T	24-08-1995
			US	5538694 A	23-07-1996
-----					
WO 9726986	A	31-07-1997	AU	1543097 A	20-08-1997
-----					

Fig. 1





European Patent  
Office

## EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number  
EP 94 12 0718

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	
A	EP-A-0 427 263 (DOW CORNING KABUSHIKI KAISHA) * claims 1-3 *	1-5,15	B01D19/04
A	EP-A-0 121 210 (UNION CARBIDE CORP.) * claims 1-3 *	1-7,9	
A	EP-A-0 499 364 (DOW CORNING CORP.) * claims 1-8 *	1	
D	& US-A-5 262 088		
A,D	EP-A-0 341 952 (DOW CORNING CORP.) * claims 1-3 *	1,8,9	
A	EP-A-0 163 541 (DOW CORNING KABUSHIKI KAISHA) * claims 1-9 *	1,8,9	
D	& US-A-4 639 489		
A	EP-A-0 298 402 (DOW CORNING CORP.) * claims 1-7 *	10-12	
D	& US-A-4 853 474		
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.)
			B01D
<p>The present search report has been drawn up for all claims</p>			
Place of search	Date of completion of the search	Examiner	
BERLIN	17 May 1995	Bertram, H	
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document			
T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			